第 34 卷 第 3 期　　昆 虫 学 报　　Vol. 34, No. 3
1991 年 8 月　　ACTA ENTOMOLOGICA SINICA　　Aug., 1991

三眠蚕诱导剂咪唑类物质 KK-42 对桑蚕内分泌系统的作用

吴 金 美
(中国农科院蚕业研究所，镇江 212018)

吴 载 德　　徐 俊 良
(浙江农业大学蚕学系，杭州 310029)

曹 梅 讯
(中国科学院上海昆虫研究所，上海 200025)

摘要　为了研究作为三眠蚕诱导剂的一种咪唑类化合物 KK-42 的作用机制，本文应用咽侧体(CA)短期体外放射化学分析技术测定了桑蚕 *Bombyx mori* 咽侧体的活性；并通过蜕皮激素 (MH) 的放射免疫分析 (RIA) 法测定了血淋巴内蜕皮激素滴度的变化；同时结合器官培养和蜕皮激素的放射免疫法，成功地测定了 KK-42 作用后的脑分泌促前胸腺激素 (PTTH) 动态。并结合其它几个方面的试验，提出了 KK-42 作用的新解说。咽侧体活性的测定及 KK-42 与咽侧体体外培养的结果表明，KK-42 应用于桑蚕四龄前期时，靶器官首先是咽侧体，咽侧体合成活性的变化反馈到脑，使脑分泌 PTTH 产生相应变化，从而引起蜕皮激素高峰的推迟。推迟了的蜕皮激素峰与相对缺乏的保幼激素(JH)共同作用的结果引起了化蛹蜕皮，产生了三眠蚕。

关键词　桑蚕　KK-42　保幼激素　蜕皮甾类激素　促前胸腺激素　放射免疫测定

昆虫抗保幼激素自七十年代发现以来，以其特有的作用引起了国外昆虫学家的广泛兴趣。这类物质用于不同龄期的桑蚕 *Bombyx mori* 幼虫，可诱导三眠蚕产生超细纤度的茧丝。近期报道还发现 KK-42 等的其它一些作用，认为该类物质对桑蚕产卵的影响及 KK-42 能解除天蚕卵的滞育等(谈恩智等,1986;木村敬助,1986);桑蚕五龄期用咪唑类物质 SSP-11 处理后能增加茧层重和茧层率 (Kiuchi 和 Akai, 1985); SM-1 对家蚕丝蛋白合成的影响(戴祝英等,1987);早熟素对性外激素的分泌、滞育的调节等均有影响 (Bowers, 1983)。

迄今已知的十几种抗保幼激素类物中，早熟素的作用机制是现在搞得最为清楚的一个。对 KK-42、KK-22 等咪唑类化合物作用机制的研究刚开始，且尚存不少争议。一种观点认为该类物质起着抗保幼激素的作用，主要依据是摘除咽侧体与使用该物质均可产生三眠蚕，而且 KK-42 的效应可被外源保幼激素类似物 (JHA) 所中止或保留；而以日本山下兴亚为代表的另一种观点认为，该类物质起抗蜕皮激素的作用，其依据是血淋巴

本文于 1989 年 5 月收到。

内蜕皮激素放射免疫的测定结果。本文试图通过实验结果较全面地分析 KK-42 对内分泌系统的作用机理。

材 料 与 方 法

一、材料

供试蚕为夏秋蚕品种苏 12 × 浙农 1 号。

KK-42 (1-苯甲基-5-[反-2,6-二甲基-1，5-庚二烯]咪唑) 由中国科学院上海有机化学研究所提供。

TC199 培养基、Hepes 缓冲剂及 Ficoll 为美国 Sigma 公司产品。

L-[甲基-^{14}C] 甲硫氨酸为英国放射化学中心 (Amersham 公司)产品，比强 58mci/mmol。

二、方法

1. 咽侧体短期离体放射化学分析

根据 Feyereisen 和 Tobe (1981) 在 Pratt 和 Tobe (1974) 方法基础上建立的昆虫咽侧体释放保幼激素的快速测定方法略作修改。在冷却的 Ringers 生理盐水中解剖桑蚕幼虫的咽侧体，放在 100 微升 TC199 培养液中。培养液内含有 25 mmol 的 Hepes 缓冲剂，10mg/ml Ficoll 400 及 L-[甲基-^{14}C] 甲硫氨酸(最终比活 38 mci/mmol，浓度为 0.28 mmol)。5 对咽侧体于上述培养基内，于 38℃ 温育 3 小时。培养后将 300 μl 异辛烷加入培养液中充分混合，4000 rpm 离心 5 分钟。取 200 μl 上清液加入到盛有 7ml 二氧六环闪烁液的闪烁瓶内，用 LKB 计数器测定其放射性。

2. 咽侧体体积的测定

逐日解剖桑蚕幼虫的咽侧体，在显微镜下量其长径及短径，按椭圆体积公式 $V=4\pi ab^2/3$ 计算其体积，共重复七次。

3. 血淋巴蜕皮激素的放射免疫测定

蜕皮激素的放射免疫测定 (MH-RIA) 参照曹梅讯(1986)建立的方法在中国科学院上海昆虫研究所进行。首先吸取血样，用无水乙醇沉淀血样中的蛋白质后蒸干上清液；然后加一定量的^{125}I-蜕皮激素抗血清，测定总的放射强度。在 4℃ 中过夜，加 DCC (1% 葡聚糖活性悬浮液)，于 4℃ 下 3000 rpm 离心去上清液，测沉淀物的放射性强度。与此同时测定标准样品，制作标准曲线。从测得沉淀物的放射性强度推算样品的蜕皮激素含量。

4. 脑分泌 PTTH 活性的测定

逐日剖取脑及五龄 6 日蚕的前胸腺，于 TC199 中培养 8 小时，培养液供 MH-RIA 测定用；对照组仅用另一侧的前胸腺培养而无脑。两种培养液中蜕皮激素含量之差即表示脑分泌促前胸腺激素 (PTTH) 的活性。四龄饷食后每隔 12 小时测一次 PTTH。

5. KK-42 对体外培养咽侧体的影响

取前述含 L-[甲基-^{14}C] 甲硫氨酸、Hepes 及 Ficoll 的 TC199 培养液 100 μl，加入不同浓度极微量的 KK-42 后于旋涡混合器中混合均匀，将五龄第 2 日的咽侧体置于上述培养基内，在 30℃ 中温育 3 小时，其后的测定方法同方法 1。

结 果

一、KK-42 对咽侧体合成活性的影响

四龄饷食起处理组以 300 ppm KK-42 喷涂桑叶，共添食 48 小时；以处理组的相应溶剂作对照，自四龄第 2 日起逐日测定咽侧体活性，结果见图 1。

从图 1 可见，KK-42 处理后咽侧体活性随发育逐渐下降，至四龄第 6 日降至最低水平。对照组咽侧体的活性分别于四龄和五龄前期达到高峰；四龄将眠时仍具有一定的活性；五龄第 3 日降至最低水平。

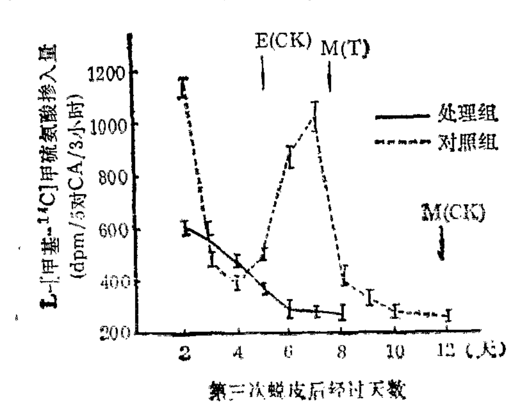


图 1 体内咽侧体合成变化过程
E：蜕皮； M：上簇； I：三次重复标准差

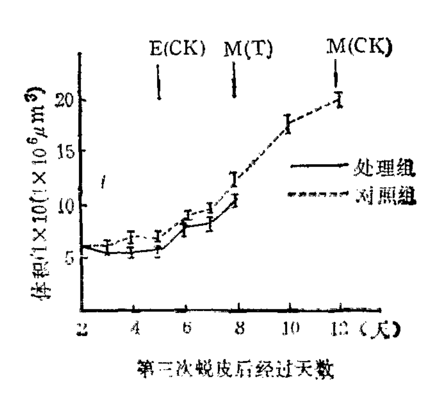


图 2 咽侧体体积变化过程
E：蜕皮； M：上簇 I：七次重复标准差

二、咽侧体体积的变化

在马德拉蜚蠊等许多昆虫中，曾报道咽侧体活性与其体积有密切的关系。(Scharrer, 1964)。为进一步证实 KK-42 的作用，而测定逐日咽侧体体积变化(见图 2)。

从图 2 可见，对照组咽侧体体积总的呈上升趋势。KK-42 处理组在四龄第 2、3、4 日咽侧体体积略有减少，对照组体积在此期间却有增长。四龄第 4 日处理组 CA 体积仅为

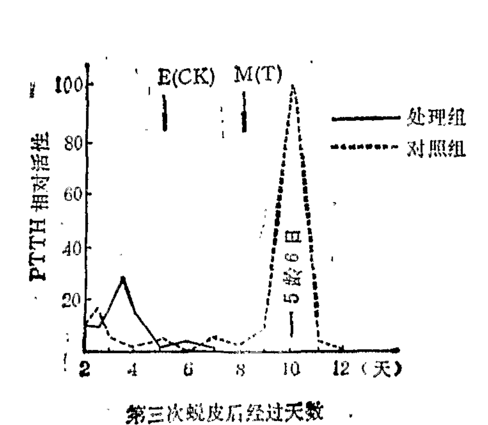


图 3 脑分泌 PTTH 变化情况
E：蜕皮； M：上簇

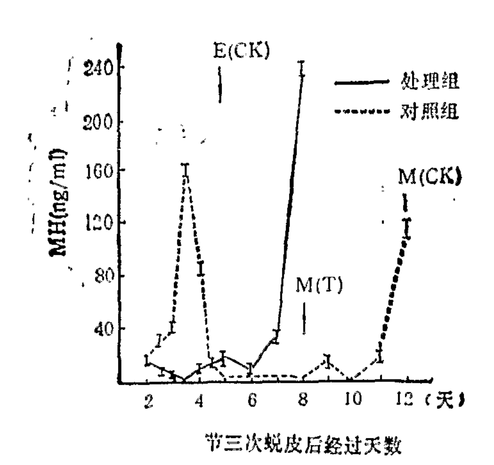


图 4 血淋巴 MH 滴度变化
E：蜕皮； M：上簇； I：三次重复标准差

对照组的 74%，此后对照组与处理组间的 CA 体积差距变小。可见 KK-42 处理对CA体积的增长具有一定的抑制作用。

三、脑分泌 PTTH 的情况

脑分泌 PTTH 情况见图 3，对照组脑分泌的 PTTH 活性共出现两个峰：一个是在四龄中期，此峰较小；另一个是五龄第 6 日有一较高的峰。而处理组却在四龄中期稍后（与对照峰间隔 24 小时）才出现 PTTH 峰。此峰略高于对照组四龄的峰值，此后直至老熟前不再出现另一个高峰。

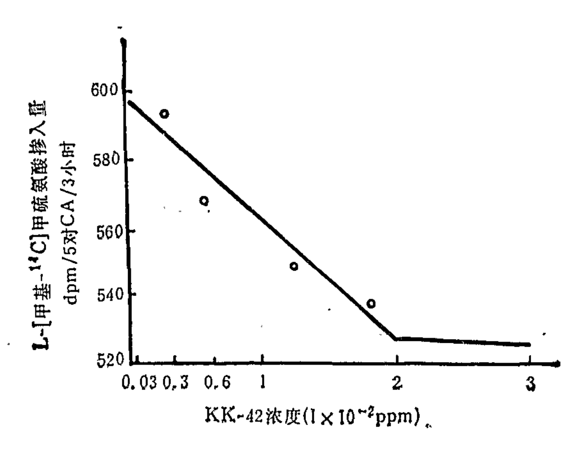


图 5　不同浓度 KK-42 对 CA 合成活性的抑制

四、血淋巴蜕皮激素滴度

从图 4 可见，对照组血淋巴分别于四龄近末期和五龄末期出现蜕皮激素的高峰，而处理区仅出现一个蜕皮激素的高峰，此峰出现在蚕儿开始上簇吐丝时，较对照组第一个蜕皮激素峰后延约 4.5 日。

五、体外 KK-42 对咽侧体活性的直接抑制作用

把 5 对咽侧体置入含有不同剂量的 KK-42 的 TC199 培养液中进行体外培养，结果如图 5 所示。KK-42 对咽侧体的保幼激素合成显示了有效的抑制作用，测出最大抑制剂量的一半约为 1×10^{-2} ppm，即 3×10^{-8} mol/L。可见，KK-42 可以直接作用于咽侧体，抑制咽侧体的合成。

讨　　论

从以上试验结果可知，KK-42 最初作用的靶器官是咽侧体。KK-42 处理四龄起蚕时，咽侧体活性即受到明显的抑制，处理组的活性仅为对照组活性的 1/2。从咽侧体体积的变化来看，处理组在前期 CA 体积的增长也明显地受到了抑制。体外 KK-42 对 CA 活性的直接抑制作用证明了这一点，而脑分泌 PTTH 的变化则发生于 CA 活性变化之后。KK-42 处理初期，PTTH 活性在处理组与对照组间并无差异，随后对照组 PTTH 活性开始上升，处理组基本上保持原水平，直至四龄第 3 天才出现 PTTH 的分泌高峰。由于 PTTH 有促进前胸腺分泌作用，因此 KK-42 处理后 PTTH 分泌高峰的延迟产生了血淋巴内蜕皮激素浓度的相应变化。对照组四龄中期的 PTTH 峰引起了四龄末期蜕皮激素浓度的升高；而处理组脑分泌 PTTH 活性高峰比对照组四龄期峰的延迟则使血淋巴中 MH 峰也相应延迟，该峰与体内相对较低的保幼激素共同作用引起了桑蚕的化蛹蜕皮。

长期以来，人们普遍认为内分泌系统中的主要作用因子是脑神经激素，神经肽类激素调节着保幼激素和蜕皮激素的合成、分泌，因而调节了生长发育期间这些激素的滴度。但随着近年来内分泌调控研究的深入，这一作用的传统模式已得到了新的发展。脑-后脑复合体体外培养方法的成功已使各种因子调节 PTTH 释放的直接研究成为可能，这些因

子包括外部的、内部的因子以及其它激素的"信号"，这些信号之一即为保幼激素（JH）。JH 可直接反馈作用于脑，是决定生长发育中 PTTH 释放时间的主要因子之一（Bollenbacher, 1987; Hiruma, 1982; Steel, 1985; Kikukawa 和 Tobe, 1986）。

基于上述理论，KK-42 作用于 CA 后引起 PTTH 分泌高峰的推迟也得到了合理的解释。对照组 CA 活性在四龄第 2 日时达到近 1110 dpm/5 对 CA/3 小时，峰高且陡；而处理组四龄第 2 日仅 600dpm/5 对 CA/3 小时，此后活性缓慢下降，直至第 6 日接近于最低水平，峰低且宽。据此笔者认为，一定的保幼激素滴度（或即使未达到该特定的滴度）在较低的滴度下，经一定的作用时间对 PTTH 开"闸"的迟早有重要影响，即 JH 的滴度和作用时间是决定 PTTH 分泌迟早的重要因子之一。由于 PTTH 的延迟分泌也相应导致了 MH 的分泌延迟，当处理组出现 MH 峰时，JH 滴度已下降至最低水平，从而进行变态蜕皮——化蛹蜕皮。而对照组在四龄末期出现 MH 峰时，血淋巴 JH 滴度仍维持着相对较高的水平，因此所进行的蜕皮仍为幼虫蜕皮。

曾有报道咪唑类化合物的效果可完全被同时使用的保幼激素类似物 Methoprene 所阻碍（Asano, 1986; Kuwano, 1983），这些也说明了该类物质的作用器官首先是咽侧体，因而增加 Methoprene 的量能减轻原效应。

参 考 文 献

戴祝英等 1987 三眠蚕诱导剂 SM-1 对家蚕丝蛋白合成调控机理的研究。蚕业科学 13(3): 138—43。

木村敬助 1986 幼若ホルモン及び抗幼若ホルモン活性物質の家蚕产卵性に及ぼす影響。日蚕雑 55(4): 335—7。

谈恩智等 1986 抗幼若ホルモン剤(KK—42)による天蚕卵的休眠打破。日蚕雑55(4): 305—8。

Asano, S. 1986 Anti-juvenile hormone activity of imidazole compound (KK-22) and its diminution by Methoprene in the 4th instar silkworm, *Bombyx mori L. Appl. Ent. Zool.* 21(1): 63—9.

Bollenbacher, W. E. 1987 Interendocrine regulation of insect development: the involvument of cerebral neurohormones. Proceeding of the 1st Congress of the Asia and Oceania Society for Comparative Endorinology p. 228—229.

Bowers, W. S. 1983 The precocenes. in Downer R. G. H. & Laufer H. (ed.): 'Endocrinology of Insect', New York, Alan R. liss Inc. p. 517—523.

Feyereisen R. & S. S. Tobe 1981 A rapid partition assay for routine analysis of juvenile hormone release by insect corpora allata. *Anal. Biochem* 111: 371—5.

Hiruma, K. 1982 Factors affecting change in sensitivity of prothoracic glands to juvenile hormone in *Memestra Brassicae. J. Insect Physiol.* 28(2): 193—9.

Kikukawa, S. & S. S. Tobe 1986 Juvenile hormone biosynthesis in female larva of *Diploptara punctata* and the effect of allatectomy on haemolymph ecdysteroid titre. *J. Insect Physiol.* 32: 981—6.

Kiuchi, M. & H. Akai 1985 Increase of cocoon shell weight and shell ratio by anti-JH administration during the fifth larval instar in *Bombyx mori, J. Seric. Scie. Japan.* 54(6): 527—8.

Kuwano, E. 1983 Terpenoid imidazoles: new anti-juvenile hormone, *Agri. Biol. Chem.* 47(4): 921—3.

Pratt, G. E. S. S. Tobe 1974 Juvenile hormones radiobiosynthesised by corpora allata of adult female locust *in vitro. Life Sci.* 14: 575—86.

Scharrer, B. 1964 Histophysiological studies on the corpus allatum of *Leucophaea maderae. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 62: 126—48.

Steel, C. G. H. & K. G. Davey 1985 Intergration in the insect endocrine system. *Comp. Insect. Phys. Biochem. Pharm.* 7: 1—35.

THE EFFECT OF TRIMOLTER INDUCER KK-42 ON THE ENDOCRINE SYSTEM IN THE SILKWORM *BOMBYX MORI*

Wu Jin-mei

(Institute of Sericulture, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212018)

Wu Zai-de Xu Jun-liang

(Department of Sericulture, Zhejiang Agriculture University, Hangzhou, 310029)

Cao Mei-xun

(Shanghai Institute of Entomology, Academia Sinica, Shanghai, 200025)

In order to study the mechanism of action of the imidazole compound KK-42 which acts as an inducer of trimolter silkworm, the synthesis of juvenile hormone (JH) by isolated silkworm corpora allata (CA) was determined *in vitro* by means of a short-term radiochemical assay. The ecdysone titers in the haemolymph were determined accoirding to the method of radioimmunoassay. Combining the culture of the prothoracic glands (PG) and brains with the radioimmunoassay of ecdysone (MH), the secretory kinetics of PTTH in the brains after treatment with KK-42 was determined successfully. Together with other experiments, a new theory about the mechanism of KK-42 action is proposed.

The result of the study on the synthetic activities of CA and the CA incubated with KK-42 *in vitro* indicated that the target organ of KK-42 was CA. When KK-42 was applied in the early stage of the fourth instar, the synthetic activity of CA was decreased. Accordingly, it fedback to the brain so that the PTTH secretion was also decreased. The latter action delayed the increase of MH titer in the haemolymph. It was the co-action of this delayed MH peak and relatively lower JH titer that induced the precocious pupation and the trimoltism of the silkworm.

Key words *Bombyx mori*——KK-42——juvenile hormone——ecdysone——PTTH——radioimmunoassay